



Diversidade bacteriana em solos tratados com associação de cascalho de perfuração de poços de petróleo e torta de mamona⁽¹⁾

Jéssica de Oliveira Lima⁽²⁾; Bruno Oliveira de Carvalho⁽³⁾; Fábio Cardoso de Freitas⁽⁴⁾; Miliane Moreira Soares de Souza⁽⁵⁾; Everaldo Zonta⁽⁵⁾ & Irene da Silva Coelho⁽⁵⁾

⁽¹⁾Trabalho executado com recursos da FAPERJ – Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro

⁽²⁾Discente do Curso de Agronomia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, RJ; jessicalyama00@hotmail.com; ⁽³⁾Doutor pelo programa PPGCTIA da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

⁽⁴⁾Professor; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto Três Rios; ⁽⁵⁾Professor; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO: A indústria energética atualmente gera milhões de resíduos e a reutilização destes representa um benefício inquestionável. O presente trabalho possui o objetivo de avaliar o efeito da associação entre torta de mamona e cascalho de perfuração de poços de petróleo em solos cultivados com girassol e mamona na diversidade bacteriana, através da técnica molecular de Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*- DGGE) e da técnica de cultivo em meios de cultura. Houve correlação significativa entre o teor de magnésio no solo e a contagem de bactérias mesófilas em meio PCA (*Plate Count Ágar*) e no número de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) no DGGE. Estes resultados mostram que as variações do teor de magnésio acompanhou a mudança na diversidade bacteriana nos diferentes tratamentos tanto pela metodologia dependente quanto pela metodologia independente de cultivo, confirmando a eficiência destes métodos na avaliação da diversidade bacteriana.

Termos de indexação: DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), métodos independentes do cultivo, resíduos da agroindústria.

INTRODUÇÃO

O Brasil é referência na produção de agroenergia. Programas como os do etanol e do biodiesel atraem a atenção do mundo por ofertar alternativas econômica e ecologicamente viáveis à substituição dos combustíveis fósseis, entretanto, este tipo de produção de energia gera resíduos que devem ser tratados, assim como os resíduos da indústria petrolífera. A reciclagem de resíduos representa um benefício inquestionável na minimização deste problema ambiental. O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da associação entre torta de mamona e cascalho de perfuração de poços de petróleo em solos cultivados com girassol e mamona na diversidade bacteriana, através da técnica molecular de Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação

(*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*- DGGE) e da técnica de cultivo em meios seletivos e não seletivos, visando o entendimento da dinâmica e a mensuração dos efeitos desses rejeitos no solo, e contribuindo para criação de planos de manejo e gerenciamento do cascalho de perfuração e torta de mamona.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental foi do tipo fatorial (2 x 3 x 2 x 3), composto por dois solos de texturas contrastantes, argissolo e planossolo. Nos solos foram aplicados 3 níveis de cascalho de perfuração (0, 10, 10 Mg.ha⁻¹) e 3 níveis de torta de mamona (0, 16, 64 Mg.ha⁻¹), e cultivados com duas oleaginosas (mamona - *Ricinus communis L.* e girassol - *Helianthus annuus*). Foram utilizados vasos fechados, com área cúbica igual a 0,0042 m³ e foram pesados 5 kg do substrato de textura arenosa (planossolo) e 4 kg do substrato argiloso (argissolo). A capacidade de campo foi mantida a 70% durante a condução do experimento.

Aos 76 dias após a semeadura foram coletadas 35 g de solos de cada tratamento. Amostras de 25 g de solo foram submetidas a diluições seriadas decimais variando de 10⁻¹ a 10⁻¹². Em seguida, alíquotas de 0,1 mL das diferentes diluições foram inoculadas em meios com distintas finalidades: meio PCA (*Plate Count Ágar*), para isolamento de bactérias mesófilas; meio AGEL (Ágar Glicerol - Extrato de Levedura), para isolamento de actinomicetos; meio AC (Ágar Caseína), para isolamento de bactérias proteolíticas e meio AMVF (Ágar Manitol Vermelho de Fenol), para isolamento de bactérias halotolerantes ou halofílicas. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 a 48 horas. Após a incubação foi feita a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) totais. Foram consideradas como contáveis as placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias (Clark, 1965; Schortemeyer et al., 1996).

Para a análise da diversidade bacteriana foi utilizada a técnica independente de cultivo através do DGGE (*Denaturing Gradient Gel*



Electrophoresis). Primeiramente fez-se extração do DNA total de bactérias do solo, utilizando o kit PowerMax™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para verificar a quantidade e a qualidade do DNA obtido as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % acrescido de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Os géis foram visualizados sob luz UV 254 nm.

Na a 1ª reação de PCR foram empregados os *primers* 27f (Suzuki & Giovannoni, 1996) e 1512r (Kane et al., 1993), que amplificam a região 16S rDNA de bactérias e que geram um fragmento de aproximadamente 1500 pb. Foram utilizados 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão de reação 1X (Fermentas), 0,2mM de dNTP (ThermoScientific), 0,1 µg.µL⁻¹ de BSA (Promega), 0,5 µM de cada primer, resultando num volume de 25 µL. As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 60 s, 68°C por 60 s e 72 °C por 60 s, seguida de uma elongação final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizado sob luz UV.

Os produtos gerados na 1ª reação foram utilizados como molde para a 2ª reação de PCR utilizando os *primers* CG-338f e 518r (Ovreas et al., 1997). As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 60 s, 55 °C por 60 s, 72 °C por 60 s, seguida de uma elongação final a 72 °C por 5 minutos.

Os produtos da segunda reação de PCR foram separados em gel de 8% de poli-acrilamida e gradiente de concentração entre 44% e 60% definido a partir da mistura de soluções de uréia e formamida deionizada. A eletroforese foi realizada a 70 V e 60°C, por 16 horas, em um equipamento Dcode™ “*Universal Mutation Detection System*” (BIO-Rad, Richmond, EUA). Os géis foram fotografados e as imagens foram analisadas com o software Bionumerics (Applied Maths, Saint-Martens-Latem) determinando-se as diferenças através do coeficiente de Dice para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No argissolo, houve aumento da contagem bacteriana no meio (PCA) em todos os tratamentos quando comparada aos controles, independente das concentrações de resíduos incorporados e do tipo

de oleaginosa cultivada (**Tabela 1**). No planossolo cultivado com girassol, houve uma redução na quantidade de UFC/g no grupo tratamento comparado ao grupo controle. No planossolo cultivado com mamona não foi possível a observação de diferenças na contagem bacteriana decorrente dos tratamentos. No argissolo cultivado com girassol, foi observada redução na contagem de actinomicetos em meio (AGEL) no tratamento com a maior concentração de cascalho de perfuração em relação ao controle. Quando cultivado com mamona, essa redução foi observada em ambas as concentrações. Em planossolo, houve um aumento na população de actinomicetos comparado ao grupo controle, independente da oleaginosa cultivada. Argissolo em meio (AMVF), não foi observada qualquer alteração na contagem bacteriana, independente das concentrações de resíduos incorporados e do tipo de oleaginosa cultivada. Em planossolo, houve aumento na contagem bacteriana quando cultivado com girassol e redução quando cultivado com mamona. Argissolo em meio (AC) gerou redução na população bacteriana independente das oleaginosas cultivadas. Em planossolo cultivado com girassol não foi possível avaliar alteração decorrente dos tratamentos. Quando cultivado com mamona, a maior concentração de cascalho de perfuração gerou uma redução na contagem bacteriana quando comparada ao controle e a menor concentração do tratamento.

O padrão de bandamento dos *amplicons* no gel de DGGE revelou a existência de diferentes unidades taxonômicas operacionais (UTOs) de bactérias, com perfis de distribuição diversos entre as amostras. Os perfis eletroforéticos demonstraram que, comparado ao grupo controle, as amostras que receberam a associação entre torta de mamona e cascalho de perfuração apresentaram um aumento na diversidade bacteriana. O aumento do número de bandas no gel foi progressivo nas amostras em que foram cultivadas mamona, tanto para o substrato planossolo quanto argissolo. Quando cultivadas com girassol, em substrato planossolo, não houve aumento do número de bandas conforme o aumento da concentração de cascalho de perfuração. Já no substrato argissolo, houve uma relação inversa, quanto maior a concentração de cascalho de perfuração, menor o número de bandas observadas no gel (**Tabela 1**). Embora o tratamento tenha gerado um aumento da diversidade bacteriana, a adição dos resíduos da indústria agroenergética não causou a seleção de populações específicas de acordo com o dendograma (**Figura 1**) elaborado para ilustrar o



agrupamento das populações bacterianas nos diferentes tratamentos.

Não houve um agrupamento baseado nos tratamentos, mas a formação de três grupos distintos G1, G2 e G3, mostrando que o aumento na diversidade bacteriana gerado pelos tratamentos não se deve ao favorecimento de populações específicas. Além disso, os controles dos tratamentos mantiveram-se juntos confirmando a autenticidade da técnica elaborada.

Diminuindo a distância euclidiana média para um intervalo entre 0,6 e 0,7 ocorre-se o agrupamento das amostras A-10/16-G e A-0/0-M que representam respectivamente o controle do cultivo de girassol e mamona na matriz argissolo. Já o agrupamento entre as amostras P-0/0-G e P-0/0-M, representativas dos controles na matriz planossolo ocorre em torno de 0,4 da distancia euclidiana média.

Foi realizada análise de correlação entre as variáveis apresentadas no experimento, a saber, quantidade de UFC/g em PCA, AGEL, AC, AMVF, quantidade de UTOs em DGGE, pH e teores de sódio disponível, Ca e Mg com objetivo de um melhor entendimento dos fatores relacionados ao aumento da diversidade bacteriana nos diferentes tratamentos. Houve correlação significativa entre o teor de magnésio no solo e a contagem de bactérias mesófilas em PCA ($r=0,58$) e no número de UTOs em DGGE ($r=0,64$). Estes resultados mostram que as variações ocorridas no teor de magnésio acompanhou a mudança na diversidade bacteriana tanto pela metodologia dependente quanto pela metodologia independente de cultivo. Yada et al. (2009), constatou que a adição de óxido de magnésio no solo gera um aumento da atividade microbiana. O magnésio é um dos minerais essenciais para o metabolismo microbiano (Bon et al., 2008).

CONCLUSÕES

A técnica de DGGE se mostra eficiente na avaliação da diversidade bacteriana por ter possibilitado detectar diferentes padrões de UTOs nos tratamentos avaliados e pela sua sensibilidade de detecção.

Pelas análises de correlação realizadas pode-se inferir sobre a influência do teor de magnésio na diversidade bacteriana.

REFERÊNCIAS

BON, E. P. S.; FERREIRA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia, produção e aplicação e mercado, Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count. In C. A. Black et al. (ed.) *Methods of soil analysis, Part 2. Agronomy* 9:1460-1466. Am. Soc. of Agron., Inc., Madison, Wis, 1965.

FREITAS, F.C. Uso de resíduo orgânico da produção de biodiesel direta da semente na atenuação dos efeitos de hidrocarbonetos de petróleo no solo. 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2009.

KANE, D. J.; SARAFIAN, T. A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S.; BREDESEN, D. E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 262(5137):1274-1277, 1993.

KENNEDY, A.C. & SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plan and Soil*, 170:75-86, 1995.

MARCIANO, C. R.; MORAES, S. O.; OLIVEIRA, F. C.; MATTIAZZO, M. E. Efeito do lodo de esgoto e composto de lixo urbano sobre a condutividade hidráulica de um latossolo amarelo saturado e não saturado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 25:1-9, 2001.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B. O uso dos Microrganismos como Bioindicadores para Avaliar Qualidade dos Solos Agrícolas (2010). Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Soil%20microorganisms> acessado em 10/07/2013

OVREÁS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L. & TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9):3367-3373, 1997.

PIRES, A. M. M. & MATTIAZZO, M. E. Avaliação da Viabilidade do Uso de Resíduos na Agricultura. Circular Técnica, EMBRAPA, Jaguariúna, SP, 2008.

SCHORTEMAYER, M.; HARTWIG, U.A.; HENDREY, G.R.; SADOWSKY, M.J. Microbial community changes in the rhizosphere of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (FACE). *Soil Biology and Biochemistry*. 28:1717-1724, 1996.

SUZUKI, M. T. & GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2):625-630, 1996.

YADA, M. M., TEIXEIRA, É. M., POÇAS, E., & BALOTA, É. L. Adição de silicato e a alteração da atividade microbiana do solo. *Synergismus scyentifica UTFPR*, (4): 1, 2009.

Tabela 1 – Caracterização química, Unidade Formadora de Colônias por grama de solo (UFC/g) de bactérias e Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) de solos tratados com torta de mamona e cascalho de perfuração e cultivados com girassol e mamona.

Amostras	pH*	Na*	Ca	Mg	Bactérias	Actinomicetos	<i>Staphylococcus</i>	Bactérias	Número de UTOs
					PCA*	AGEL*	spp. AMVF*	proteolíticas AC*	
A-0/0-G	4,8	0,2	0,5	0,1	1,78X10 ⁶	1,66X10 ⁴	4,80X10 ⁴	4,70X10 ⁴	6
A-10/16-G	5,1	2,6	1,5	0,4	1,21X10 ¹⁰	7,10X10 ⁴	9,00X10 ⁴	3,20X10 ³	13
A-10/64-G	6,6	7,3	3,5	0,7	4,30X10 ¹³	5,70X10 ³	9,00X10 ⁴	3,80X10 ³	11
A-0/0-M	4,9	0,2	0,6	0,2	3,15X10 ⁵	1,92X10 ⁴	1,04X10 ⁴	4,50X10 ⁴	6
A-10/16-M	5,2	2,1	1,4	0,3	9,00X10 ⁸	2,56X10 ³	6,20X10 ⁴	7,00X10 ⁴	8
A-10/64-M	6,6	9,4	3,6	0,5	7,00X10 ¹¹	2,03X10 ³	9,00X10 ⁴	1,60X10 ³	9
P-0/0-G	5,4	0	0,9	0,0	5,00X10 ¹²	9,70X10 ²	2,00X10 ⁵	1,36X10 ⁶	3
P-10/16-G	5,8	1,5	1,5	0,3	4,30X10 ⁸	4,30X10 ³	4,80X10 ⁶	6,70X10 ⁶	7
P-10/64-G	7,3	7	2,6	0,4	4,30X10 ⁹	7,80X10 ⁴	2,28X10 ⁶	7,50X10 ⁶	7
P-0/0-M	5,6	0	0,7	0,0	4,53X10 ¹¹	1,16X10 ³	1,16X10 ⁶	6,20X10 ⁵	5
P-10/16-M	6,1	1,3	1,3	0,2	4,00X10 ¹¹	1,12X10 ³	5,90X10 ³	1,00X10 ⁶	6
P-10/64-M	7,3	7,2	2,7	0,5	5,50X10 ¹¹	5,60X10 ⁴	8,50X10 ³	9,40X10 ³	7

*(FREITAS, 2013). PCA – Agar para Contagem em Placas, AGEL – Agar Glicerol Extrato de Levedura, AMVF- Agar Manitol Vermelho de Fenol, AC - Agar Caseína, UTOs- Unidades Taxonômicas Operacionais

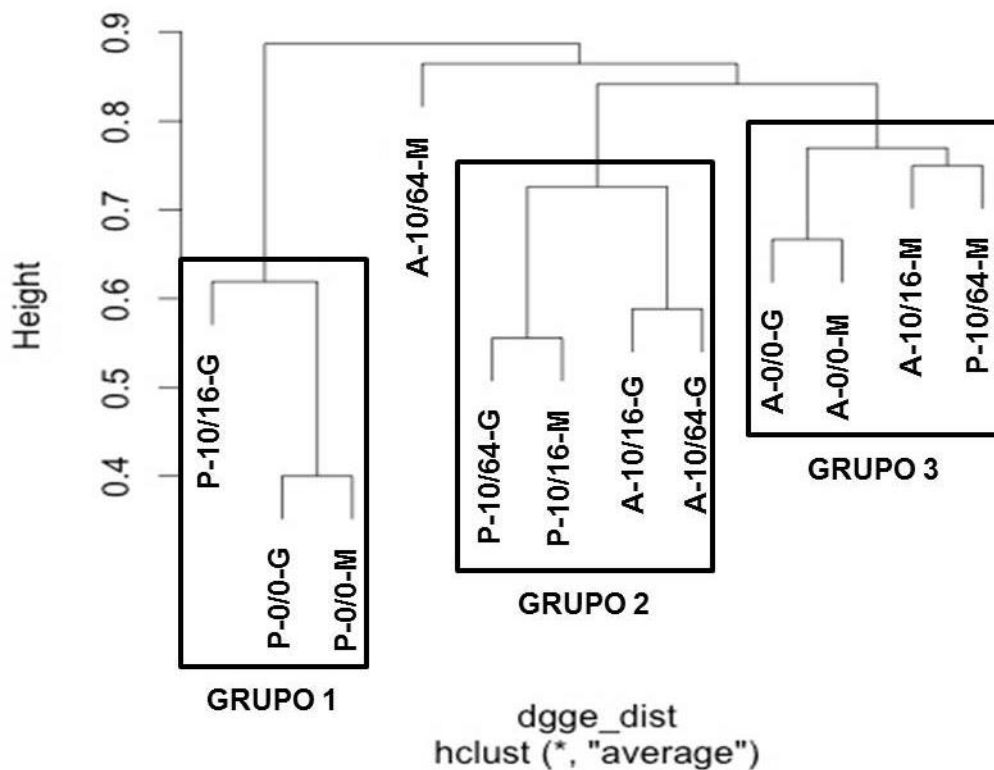


Figura 2 - Dendrograma de dissimilaridade genética do DNA total do solo após a amplificação com *primers* que amplificam a região do gene ribossomal 16S de bactérias obtido pelo método de agrupamento UPGMA.